

**EFEK SINERGISME FRAKSI ETIL ASETAT RIMPANG LENGKUAS
DENGAN FRAKSI ETIL ASETAT BUAH KEMUKUS, KULIT KAYUMANIS,
DAUN JERUK PURUT DAN BIJI PINANG TERHADAP SEL KANKER T47D**



Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I pada Fakultas Farmasi

Oleh:

DELTA NUGRAHENI SUHARJO

K 100 150 116

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
2019**

HALAMAN PERSETUJUAN

**EFEK SINERGISME FRAKSI ETIL ASETAT RIMPANG LENGKUAS
DENGAN FRAKSI ETIL ASETAT BUAH KEMUKUS, KULIT KAYUMANIS,
DAUN JERUK PURUT DAN BIJI PINANG TERHADAP SEL KANKER T47D**

PUBLIKASI ILMIAH

oleh:

DELTA NUGRAHENI SUHARJO

K 100150116

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen Pembimbing



Azis Saifudin, Ph.D., Apt.

NIK.956

HALAMAN PENGESAHAN

EFEK SINERGISME FRAKSI ETIL ASETAT RIMPANG LENGKUAS DENGAN FRAKSI ETIL ASETAT BUAH KEMUKUS, KULIT KAYUMANIS, DAUN JERUK PURUT DAN BIJI PINANG TERHADAP SEL KANKER T47D

OLEH

DELTA NUGRAHENI SUHARJO

K 100 150 116

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada hari Kamis, 8 Agustus 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dewan Penguji:

1. Maryati, Ph.D., Apt.

(Ketua Dewan Penguji)

2. Dr. Muhtadi, M.Si.

(Anggota I Dewan Penguji)

3. Azis Saifudin, Ph.D., Apt.

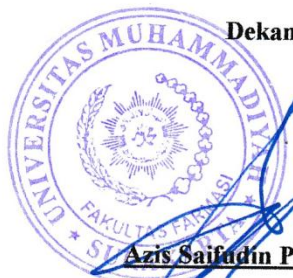
(Anggota II Dewan Penguji)

(.....)

(.....)

(.....)

Dekan,


Azis Saifudin Ph.D., Apt.
NIK. 956

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

Surakarta, 26 Juli 2019

Penulis



DELTA NUGRAHENI SUHARJO

K 100 150 116

**EFEK SINERGISME FRAKSI ETIL ASETAT RIMPANG LENGKUAS
DENGAN FRAKSI ETIL ASETAT BUAH KEMUKUS, KULIT
KAYUMANIS, DAUN JERUK PURUT DAN BIJI PINANG TERHADAP
SEL KANKER T47D**

Abstrak

Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Wild.) merupakan tanaman yang banyak diteliti sebagai agen antikanker. Tanaman lain yang juga memiliki aktivitas sitotoksik yaitu kemukus (*Piper cubeba* L.f.), kayumanis (*Cinnamomum zeylanicum*), jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) dan pinang (*Areca catechu* L.). Penelitian dilakukan untuk mengetahui efek sinergisme antara lengkuas dengan keempat tanaman tersebut terhadap sel T47D. Penelitian dilakukan dengan ekstraksi simplisia selama 3 hari. Selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan pelarut etil asetat:akuades. Aktivitas sitotoksik dilakukan dengan metode MTT. Efek sinergisme ditunjukkan dengan perbandingan nilai IC_{50} antara sampel tunggal dan kombinasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi lengkuas dengan kemukus, kayumanis, jeruk purut dan pinang tidak menghasilkan efek sinergis. Aktivitas sitotoksik keempat tanaman terhadap sel kanker T47D meningkat dengan adanya kombinasi dengan lengkuas. Nilai IC_{50} lengkuas tunggal sebesar 60,96 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan nilai IC_{50} kombinasi lengkuas-kemukus; lengkuas-kayumanis; lengkuas-jeruk purut dan lengkuas-pinang berurutan sebesar 98,88; 83,24; 69,30 dan 85,56 $\mu\text{g/mL}$.

Kata Kunci: lengkuas, MTT assay, sinergisme, T47D

Abstract

Galangal (*Alpinia galanga* (L.) Wild.) is a plant that has been studied as an anticancer agent. Other plants that also have cytotoxic activity are kemukus (*Piper cubeba* L.f.), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) and areca nut (*Areca catechu* L.). The study was conducted to determine the effect of synergism between galangal and the four plants on T47D cells. The study was conducted by extraction of simplicia for 3 days. Then the fractionation was carried out with ethyl acetate : aquades. Cytotoxic activity was tested by using MTT assay. The synergistic effect is indicated by comparing of IC_{50} values between single and combination sample. The results showed that the combination of galangal with kemukus, cinnamon, kaffir lime and areca nut does not showed synergism effect. The cytotoxic activity of the four plants against T47D cancer cells increased with combination with galangal. The IC_{50} value of single galangal is 60.96 $\mu\text{g/mL}$ while the IC_{50} value of galangal is a

combination of galangal; galangal-cinnamon; galangal kaffir lime and areca nut respectively 98.88; 83.24; 69.30 and 85.56 µg/mL.

Keywords: galangal, MTT assay, synergism, T47D.

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit yang menjadi penyebab utama kematian di dunia. Persentase penyakit kanker di Indonesia tahun 2013 sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 jiwa. Kanker payudara menempati posisi kedua setelah kanker serviks yaitu sebesar 0,5% (Kemenkes RI, 2015). Kanker merupakan penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel secara terus-menerus, invasi jaringan lokal, dan tidak terbatasnya metastasis. Perbedaan antara sel normal dengan sel kanker adalah sel normal diatur dengan sinyal yang mengontrol pertumbuhan dan proliferasi sel, sedangkan sel kanker merupakan sel normal yang mengalami perubahan genetik atau epigenetik akibat agen fisik, kimia atau biologis yang merusak sel, memperbanyak sel yang rusak tersebut, menghambat proses apoptosis, membuat jalan melalui pembuluh darah baru dan akhirnya menyebar ke tempat lainnya secara luas (Dipiro *et al.*, 2017).

Tujuan terapi kanker berkaitan dengan stadium kanker yang dialami dan keadaan patofisiologi pasien. Pertama, sebagai agen kuratif untuk menyembuhkan pasien dengan kanker lokal atau regional. Kedua, sebagai agen paliatif untuk memperlambat perkembangan kanker dan memperpanjang kelangsungan hidup pada pasien dengan kanker metastatik (Dipiro *et al.*, 2017). Obat herbal yang biasanya digunakan sebagai agen antikanker adalah alkaloid vinka, taxan, podofilotoksin, dan kamptotekin. Hampir 50% dari obat yang ada berasal dari tanaman, sehingga sumber-sumber alami, terutama tanaman dapat diselidiki untuk obat-obatan yang efektif dalam pengobatan kanker (Safarzadeh *et al.*, 2014).

Tanaman yang diselidiki memiliki aktivitas antikanker diantaranya, lengkuas, kemukus, kayumanis, jeruk purut dan pinang. Lengkuas mengandung senyawa 1'-S-1'-acetoxyeugenol acetate, 1'-S-1'-acetoxychavicol acetate, 2-propenal, 3-[4-(acetyloxy)-3-methoxyphenyl], socoronarin D dan caryolane-1, 9β-diol (Zeng *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan Hidayati (2019) menunjukkan

bahwa fraksi etil asetat rimpang lengkuas yang berasal dari Boyolali memiliki aktivitas sitotoksik dengan IC_{50} sebesar 52,17 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak kemukus mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, lignan dan terpenoid termasuk aschantin, dihidrocubebin, piperin alkaloid dan piperol Junqueira *et al.*, (2007). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mulyawati (2017), menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan fraksi kloroform kemukus memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker T47D dengan nilai IC_{50} sebesar 134,95 dan 225,30 $\mu\text{g/mL}$.

Kulit kayumanis mengandung 65-80% sinamaldehyd dan 5-10% eugenol (Rao and Gan, 2014). Ekstraksi kayumanis dengan metode sokletasi menghasilkan ekstrak yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7. Aktivitas sitotoksik tersebut memiliki nilai IC_{50} sebesar 58,00 $\mu\text{g/mL}$ (Wahab *et al.*, 2017). Daun jeruk purut mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid, tannin dan saponin (Tunjung *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Anggraini (2014) menunjukkan bahwa ekstrak etanol, kloroform dan etil asetat daun jeruk purut memiliki aktivitas sitotoksik yang moderat terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} berurutan sebesar 444,00; 128,89 dan 283,12 $\mu\text{g/mL}$. Pinang mengandung alkaloid, flavonoid, tannin, triterpen dan steroid. Flavonoid yang terkandung dalam pinang yaitu jacareubin memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel SGC-7901 dan sel SMMC-772 (Peng *et al.*, 2015). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fitria (2007) menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi heksan dan fraksi kloroform biji pinang memiliki aktivitas sitotoksik yang potensial tinggi terhadap sel kanker T47D dengan nilai IC_{50} berurutan sebesar 50, 39 dan 27 $\mu\text{g/mL}$.

Kombinasi merupakan salah satu strategi untuk meningkatkan efektivitas pengobatan. Efek kombinasi yang ideal adalah senyawa yang dikombinasi memiliki efek sinergis melawan sel kanker (CCRC, 2009). Sinergisme merupakan peningkatan efek suatu senyawa karena adanya satu atau beberapa senyawa tertentu, jika suatu senyawa dalam keadaan tunggal efeknya sangat lemah ataupun tidak berefek. Senyawa-senyawa dapat berupa ajuvan, meningkatkan absorpsi, meningkatkan transport ke dalam sel terhadap molekul prinsip, mencegah efluks pengeluaran dari sel (Saifudin, 2014).

Penelitian terkait kombinasi biji pinang dengan doksorubisin dilakukan oleh Fitria (2007) terhadap sel kanker T47D menunjukkan bahwa ekstrak etanol (EP), fraksi heksan (FHP) dan fraksi kloroform Pinang (FKP) memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} berurutan sebesar 50, 39 dan 27 $\mu\text{g/mL}$. Doksorubisin memiliki efek sitotoksik dengan nilai IC_{50} sebesar 32 nM (0,017 $\mu\text{g/mL}$). Kombinasi doksorubisin-EP dan doksorubisin-FKP pada sel T47D memberikan efek sinergisme dengan konsentrasi kombinasi berurutan sebesar 6 nM-8 $\mu\text{g/mL}$ dan 11 nM-10 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai $CI < 0,5$.

Berdasarkan pemaparan di atas, maka penting dilakukan penelitian untuk mengetahui efek sinergisme fraksi etil asetat rimpang lengkuas dengan fraksi etil asetat buah kemukus, kulit kayumanis, daun jeruk purut dan biji pinang terhadap aktivitas sel kanker T47D. Harapannya kombinasi keempat tanaman dengan lengkuas memiliki aktivitas sitotoksik yang sinergis terhadap sel kanker sehingga dapat dijadikan alternatif pengobatan kanker khususnya kanker payudara.

2. METODE

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Almari pengering (Autonics), neraca analitik (Ohaus, Precissa), bejana maserasi, *vacuum* Buchner, *rotary evaporator* (Heidolph), almari asam, tabung konikal steril (Nunc), eppendorf, mikropipet (Socorex), *cell counter*, *incubator* CO_2 (Binder), *96-well plate* (Iwaki), vortex (Thermolyne), *Cytotoxic Safety Cabinet* (Isocide), *haemocytometer* (Assistent), *low vacuum* (GEA Medical), optilab (Miconos), *inverted microscope* (Olympus CKX41), dan *ELISA reader* (Elx 800 Bio Tech).

2.1.2 Bahan

Rimpang lengkuas diperoleh dari daerah Boyolali. Sementara daun jeruk purut, simplisia buah kemukus, kulit kayu manis, dan biji pinang diperoleh dari daerah Surakarta. Bahan lainnya seperti metanol, etil asetat, akuades, sel T47D, penisilin-streptomisin 1%, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Trypsin-EDTA*

(*Ethylenediaminetetraacetic acid*), *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) 0,1%, reagen *Microculture Tetrazolium* (MTT) 0,5% (50mg MTT dalam 10 mL PBS), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10% dalam HCl 0,01N, doksorubisin 2%, aluminium foil, *yellow tips* dan *blue tips*.

2.2 Jalannya Penelitian

2.2.1 Ekstraksi dan Fraksinasi

Simplisia masing-masing tanaman dimaserasi sebanyak 100 g dengan 10 bagian metanol selama 3 hari dalam keadaan gelap kemudian diaduk. Maserat dipisahkan dari ampas dengan proses penyaringan menggunakan *vacuum* Buchner. Pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 64,7°C dan dilanjutkan penguapan sisa pelarut pada suhu ruang selama 2 hari. Selanjutnya satu gram ekstrak kental dilarutkan dengan akuades dan dipartisi menggunakan etil asetat. Lapisan atas (partisi etil asetat) diambil dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 77,1°C dan dilanjutkan penguapan sisa etil asetat dalam lemari asam pada suhu ruang selama 2 hari.

2.2.2 Pembuatan Larutan Uji

Sampel sebanyak 10 mg ditimbang dan dilarutkan dalam 100 µl DMSO kemudian di vortex selama 5 menit dan ditambahkan 900 µl media. Dibuat larutan stok 1% dan dilakukan pengenceran bertingkat dengan seri konsentrasi 25; 50; 100; 200; dan 400 µg/mL. Pembuatan seri konsentrasi 400 µg/mL diambil 40 µl dari stok 1% dan ditambahkan media RPMI hingga 1 mL, sedangkan untuk kombinasi diambil 20 µl dari stok 1% lengkuas dan 20 µl dari stok 1% sampel tanaman lain dan ditambahkan media RPMI hingga 1 mL.

2.2.3 Uji Aktivitas Sitotoksik

Sel T47D dengan kepadatan 1×10^4 sel/sumuran dimasukkan ke dalam 96-well plate sebanyak 100 µl, dibiarkan 3 sumuran kosong untuk kontrol media (RPMI). Sebanyak 100 µl seri konsentrasi sampel, kontrol positif doksorubisin, kontrol pelarut DMSO, kontrol media RPMI, dan kontrol sel T47D dimasukkan dalam sumuran (triplo) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂. Selanjutnya media sel dibuang, dan ditambahkan reagen MTT pada tiap-tiap sumuran sebanyak 100 µL. Sel diinkubasi selama 2-4 jam dalam

inkubator CO₂ hingga terbentuk kristal formazan, kemudian ditambahkan 100 µL larutan *stopper* SDS 10% dalam 0,01N HCl. *Plate* dibungkus dengan aluminium foil diinkubasi di tempat gelap pada suhu kamar selama 24 jam. Absorbansi sel dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm. Dibuat grafik absorbansi vs konsentrasi dan dihitung nilai IC₅₀.

2.2.4 Model Analisis Data

- Jika absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}) \times 100\%}{(\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media})}$$

- Jika absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}) \times 100\%}{(\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media})}$$

Dibuat grafik log konsentrasi vs prosentase sel hidup, dihitung persamaan regresi linearnya, $y = Bx + A$. Nilai x di cari dengan memasukkan nilai $y = 50\%$. Nilai IC₅₀ diperoleh dari antilog konsentrasi (CCRC, 2009).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi dan Fraksinasi

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol. Pemilihan pelarut didasarkan pada kandungan senyawa yang terdapat pada masing-masing tanaman. Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Will.) mengandung senyawa golongan fenilpropanoid (Chouni and Paul, 2018) diantaranya 1'-S-1'-acetoxyeugenol acetate dan 1'-S-1'-acetoxychavicol acetate (Zeng *et al.*, 2015). Menurut Suhendi *et al.*, (2017) senyawa golongan fenilpropanoid bersifat semipolar. Senyawa yang bersifat semi polar ini mudah larut dalam pelarut kloroform, DMSO dan metanol (TCI, 2018).

Menurut Junqueira *et al.*, (2007), ekstrak kemukus mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, lignan dan terpenoid termasuk aschantin, dihidrocubebin, piperin alkaloid dan piperol. Senyawa terpenoid yang tersusun atas rantai panjang hidrokarbon menyebabkan senyawa ini bersifat nonpolar. Pada umumnya, sebagian besar terpenoid tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut seperti etanol, metanol, kloroform dan dietil eter (TCI, 2018). Sameni *et al.*, (2017)

menyatakan bahwa lignin akan banyak terlarut dalam pelarut terhidroksilasi seperti metanol dan etanol dibandingkan pelarut nonpolar. Kulit kayumanis mengandung 65-80% sinamaldehyd dan 5-10% eugenol (Rao and Gan, 2014). Penelitian oleh Astuti (2017) menunjukkan bahwa senyawa sinamaldehyd yang terdapat dalam ekstrak kulit batang kayumanis dapat larut dalam metanol.

Daun jeruk purut diketahui mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin dan saponin (Tunjung *et al.*, 2015). Sementara Pinang mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, triterpen dan steroid. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Yubin *et al.*, (2014), alkaloid dapat larut dalam metanol dan etanol. Senyawa flavonoid umumnya tidak larut dalam air, tetapi larut dalam metanol, etanol, aseton, etil asetat, etil eter, dan pelarut organik lainnya (Ferreira dan Pinho, 2012).

Ekstrak yang diperoleh dari hasil maserasi masih kasar dan mengandung senyawa yang sangat kompleks sehingga dilakukan fraksinasi untuk mengisolasi dan memurnikan senyawa. Proses fraksinasi digunakan etil asetat yang bersifat semipolar. Hal ini dikarenakan komponen yang dianalisis bersifat semipolar (Saifudin, 2014). Rendemen hasil ekstraksi dan fraksinasi ditunjukkan pada Tabel 1.

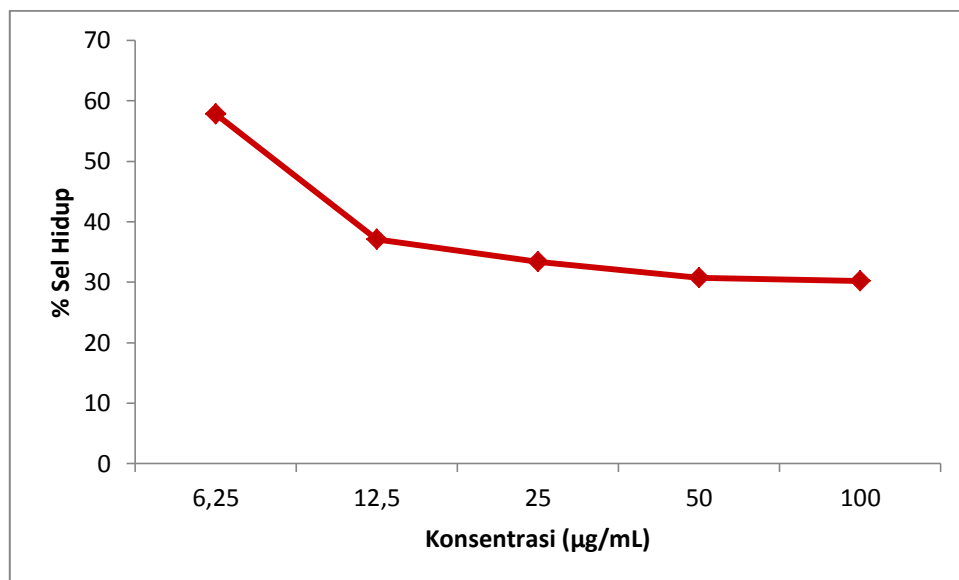
Tabel 1. Persentase Rendemen Ekstrak Metanol dan Fraksi Etil Asetat Rimpang Lengkuas, Buah Kemukus, Kulit Kayumanis, Daun Jeruk Purut dan Biji Pinang

Sampel	Berat Simplisia Kering (g)	Berat Ekstrak Kental (g)	Rendeman Ekstrak (%)	Berat Fraksi Kental (g)	Rendemen Fraksi (%)
Lengkuas	300,08	42,04	14,01	12,60	4,20
Kemukus	100,00	37,11	37,11	27,03	27,03
Kayumanis	100,02	28,60	28,59	2,85	2,85
Jeruk purut	100,01	25,91	25,91	2,76	2,76
Pinang	100,00	26,23	26,23	2,06	2,06

3.2 Aktivitas Sitotoksik

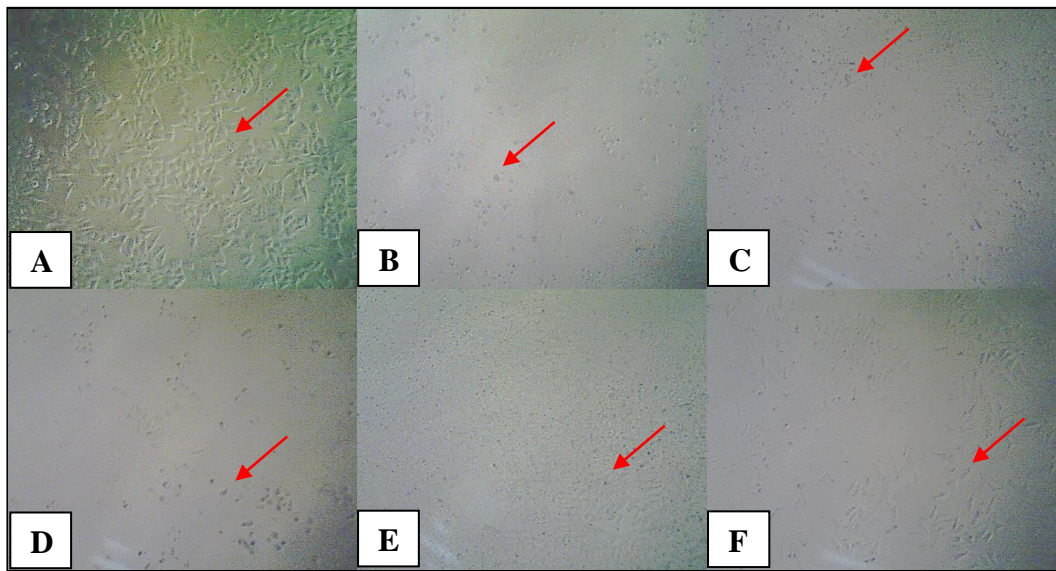
MTT assay, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid didasarkan pada reduksi garam kuning tetrazolium oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium

yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan yang berwarna ungu dan tidak larut. Kristal tersebut dilarutkan dengan reagen *stopper* dan pengukuran absorbansi menggunakan ELISA *reader*. Jumlah sel yang hidup sebanding dengan intensitas warna ungu yang terbentuk (CCRC, 2009).



Gambar 1. Grafik perlakuan doksorubisin pada sel T47D

Doksorubisin merupakan obat kemoterapi golongan Antrasiklin yang memiliki aktivitas antineoplastik. Menurut Aghaee *et al.*, (2013) doksorubisin dosis rendah memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D, sehingga doksorubisin digunakan sebagai kontrol positif. Kegunaan kontrol positif adalah untuk melihat adanya perbedaan efek sitotoksik yang dihasilkan sampel dengan efek sitotoksik obat antikanker. Mekanisme sitotoksik yang ditimbulkan doksorubisin berasal dari interkalasi doksorubisin ke dalam DNA dan gangguan perbaikan DNA yang dimediasi topoisomerase II, serta pembentukan radikal bebas dan kerusakannya pada membran sel, DNA dan protein (Thorn, 2011). Hasil penelitian menunjukkan bahwa persen sel hidup menurun dengan adanya peningkatan konsentrasi doksorubisin (*dose dependent response*) (Gambar 1) dengan nilai IC_{50} sebesar 6,35 µg/mL. Penelitian sebelumnya memiliki nilai IC_{50} sebesar 15 nM (0,008 µg/mL) (Anindyajati *et al.*, 2010).



Gambar 2. Pengamatan sel T47D secara mikroskopis dengan perbesaran 100x. Sel 80% konfluen (A); perlakuan sampel tunggal: fraksi etil asetat rimpang lengkuas konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ (B); fraksi etil asetat buah kemukus konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ (C); fraksi etil asetat kulit kayumanis konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ (D); fraksi etil asetat daun jeruk purut konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ (E); dan fraksi etil asetat biji pinang konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$ (F).

Morfologi sel T47D yang diamati seperti sel epitel (CCRC, 2009) berbentuk lonjong, menggerombol dan memiliki inti sel (Gambar 2A). Perlakuan sampel lengkuas pada sel T47D menunjukkan adanya kematian sel yang ditandai dengan perubahan bentuk sel yang mengecil, berwarna hitam dan tidak memiliki inti sel (Gambar 2B). Perlakuan sampel kemukus, kayumanis dan jeruk purut juga menunjukkan adanya kematian sel T47D (Gambar 2C, 2D, 2E). Sedangkan perlakuan sampel pinang pada sel T47D tidak menunjukkan adanya kematian sel (Gambar 2F).

Tabel 2. Nilai IC_{50} dan Kategori Aktivitas Sitotoksik menurut *National Centre Institute* (NCI) and Green *et al.*, (1972) serta Srisawat *et al.*, (2013):

No.	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Kategori Aktivitas Sitotoksik
1.	≤ 20	Sangat aktif
2.	21-200	Moderat
3.	201-500	Lemah
4.	>500	Tidak aktif

Aktivitas sitotoksik suatu agen kemoterapi ditetapkan dengan nilai IC_{50} (*Median Inhibitor Concentration*) atau konsentrasi yang dapat menghambat 50% populasi. Kategori aktivitas sitotoksik ditunjukkan pada Tabel 2. Suatu agen sitotoksik dapat dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik yang sangat poten apabila memiliki nilai IC_{50} kurang dari 20 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel 3. Nilai IC_{50} dan Kategori Aktivitas Sitotoksik Uji Tunggal Fraksi Etil Asetat Rimpang Lengkuas, Buah Kemukus, Kulit Kayumanis, Daun Jeruk Purut dan Biji Pinang

No	Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		Rata-rata IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Kategori Aktivitas Sitotoksik
		Uji 1	Uji 2		
1.	Lengkuas	46,06	75,86	60,96	Moderat
2.	Kemukus	183,23	97,66	140,44	Moderat
3.	Kayumanis	291,07	116,65	203,86	Lemah
4.	Jeruk Purut	101,62	177,83	139,73	Moderat
5.	Pinang	>500	>500	>500	Tidak Aktif

Lengkuas merupakan salah satu tanaman yang banyak diteliti sebagai agen antikanker. Lengkuas mengandung senyawa golongan fenilpropanoid (Chouni and Paul, 2018) diantaranya 1'-S-1'-acetoxyeugenol acetate dan 1'-S-1'-acetoxychavicol acetate (Zeng *et al.*, 2015). Menurut Suhendi *et al.*, (2017) 1'-S-1'-acetoxychavicol acetate (ACA) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D. Penelitian yang dilakukan Hidayati (2019) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat rimpang lengkuas yang berasal dari Boyolali memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker T47D dengan nilai IC_{50} sebesar 52,17 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lengkuas memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} sebesar 60,96 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa lengkuas memiliki kategori aktivitas sitotoksik moderat (Tabel 3).

Penelitian yang dilakukan Mulyawati (2017) menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan fraksi kloroform kemukus memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker T47D dengan nilai IC_{50} sebesar 134,95 dan 225,30 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemukus memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50}

sebesar 140,44 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa kemukus memiliki kategori aktivitas sitotoksik moderat. Ekstraksi kayumanis dengan metode sokletasi menghasilkan ekstrak yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7. Aktivitas sitotoksik tersebut memiliki nilai IC_{50} sebesar 58 $\mu\text{g/mL}$ (Wahab *et al.*, 2017). Penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa fraksi etil asetat kayumanis memiliki aktivitas sitotoksik lemah terhadap sel T47D dengan nilai IC_{50} sebesar 203,86 $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan hasil penelitian dengan penelitian sebelumnya disebabkan oleh banyaknya senyawa sinamaldehida dan eugenol yang terlarut dalam air pada saat proses fraksinasi serta perbedaan jenis sel yang digunakan dalam penelitian.

Daun jeruk purut mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid, tannin and saponin (Tunjung *et al.*, 2015). Daun jeruk purut memiliki aktivitas sitotoksik yang moderat terhadap sel kanker payudara T47D. Penelitian dilakukan terhadap ekstrak etanol, kloroform, dan etil asetat. Ekstrak kloroform menunjukkan aktivitas sitotoksik tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 128,89 $\mu\text{g/mL}$, selanjutnya diikuti ekstrak etil asetat dengan nilai IC_{50} sebesar 283,12 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak etanol memiliki nilai IC_{50} sebesar 444 $\mu\text{g/mL}$ (Anggraini, 2014). Penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun jeruk purut memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} sebesar 139,73 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa jeruk purut memiliki konsistensi kategori aktivitas sitotoksik moderat.

Pinang mengandung alkaloid, flavonoid, tannin, triterpen dan steroid. Flavonoid yang terkandung dalam pinang yaitu jacareubin memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel SGC-7901 dan sel SMMC-772 (Peng *et al.*, 2015). Penelitian oleh Fitria (2007) menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi heksan dan fraksi kloroform biji pinang memiliki aktivitas sitotoksik yang potensial tinggi terhadap sel kanker T47D dengan nilai IC_{50} berurutan sebesar 50, 39 dan 27 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa fraksi etil asetat biji pinang tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai $\text{IC}_{50} > 500$ $\mu\text{g/mL}$.

Perbedaan hasil penelitian dengan penelitian sebelumnya disebabkan karena perbedaan pelarut yang digunakan. Menurut Ferreira dan Pinho (2012)

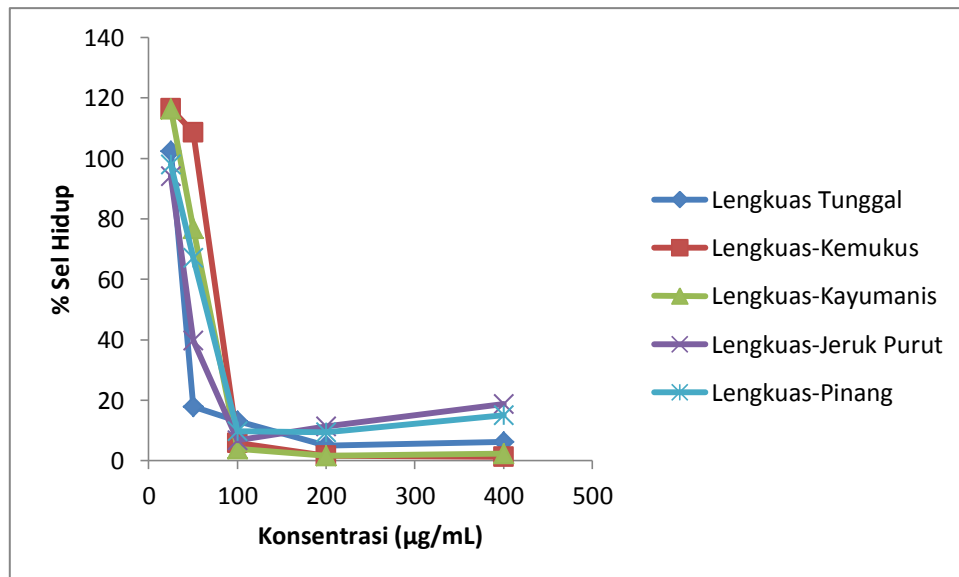
senyawa flavonoid umumnya larut dalam metanol, etanol dan pelarut organik lainnya. Hal ini yang menyebabkan crude ekstrak pinang lebih poten dibandingkan fraksi etil asetat pinang. Efek sitotoksik pinang meningkat apabila difraksi dengan pelarut yang cenderung bersifat nonpolar yaitu fraksi heksan dan fraksi kloroform karena senyawa golongan flavonoid dapat terekstraksi pada pelarut dengan polaritas lemah (Gupta *et al.*, 2018).

Tabel 4. Nilai IC₅₀ dan Kategori Aktivitas Sitotoksik Uji Kombinasi Fraksi Etil Asetat Rimpang Lengkuas dengan Fraksi Etil Asetat Buah Kemukus, Kulit Kayumanis, Daun Jeruk Purut dan Biji Pinang

No	Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)		Rata-rata IC ₅₀ (µg/mL)	Kategori Aktivitas Sitotoksik
		Uji 1	Uji 2		
1.	Lengkuas- Kemukus	104,23	93,54	98,88	Moderat
2.	Lengkuas- Kayumanis	86,49	79,98	83,24	Moderat
3.	Lengkuas- Jeruk Purut	84,53	54,07	69,30	Moderat
4.	Lengkuas- Pinang	98,17	72,95	85,56	Moderat

Peningkatan aktivitas sitotoksik dilihat dari nilai IC₅₀ atau konsentrasi yang dapat menghambat 50% populasi. Menurut CCRC (2009), efek kombinasi yang ideal adalah senyawa yang dikombinasi memiliki efek sinergis melawan sel kanker. Menurut Roell *et al.*, (2017) Sinergis umumnya didefinisikan sebagai efek dari dua atau lebih agen yang bekerja dalam kombinasi yang lebih besar dari efek aditif yang diharapkan dari agen tersebut, jika suatu senyawa dalam keadaan tunggal efeknya sangat lemah ataupun tidak berefek (Saifudin, 2014). Hasil penelitian kombinasi menunjukkan bahwa lengkuas tunggal memiliki efek sitotoksik yang lebih besar dibandingkan kombinasi lengkuas dengan keempat tanaman, sehingga dapat dikatakan bahwa kombinasi lengkuas dengan tanaman lain tidak memiliki efek sinergisme. Nilai IC₅₀ lengkuas sebesar 60,96 µg/mL, sedangkan nilai IC₅₀ kombinasi lengkuas-kemukus, lengkuas-kayumanis, lengkuas-jeruk purut dan lengkuas-pinang berurutan sebesar 98,88; 83,24; 69,30 dan 85,56 µg/mL (Tabel 4). Aktivitas sitotoksik kemukus, kayumanis, jeruk purut dan pinang jika dikombinasikan dengan lengkuas akan terjadi peningkatan aktivitas sitotoksik.

Hal ini terjadi karena efek yang dihasilkan merupakan aktivitas sitotoksik yang berasal dari lengkuas.



Gambar 4. Grafik perbandingan konsentrasi dan persen sel hidup uji kombinasi lengkuas dengan kemukus, kayumanis, jeruk purut dan pinang.

Peningkatan konsentrasi sebanding dengan adanya penurunan persen sel hidup (*dose dependent response*) terjadi pada sampel lengkuas tunggal, serta kombinasi lengkuas dengan kemukus dan kayumanis ditunjukkan pada Gambar 4. Sedangkan pada sampel kombinasi lengkuas dengan jeruk purut dan pinang terjadi peningkatan persen sel hidup pada konsentrasi 200 dan 400 µg/mL. Menurut Roell et al., (2017) Sinergis umumnya didefinisikan sebagai efek dari dua atau lebih agen yang bekerja dalam kombinasi yang lebih besar dari efek aditif yang diharapkan dari agen tersebut, jika suatu senyawa dalam keadaan tunggal efeknya sangat lemah ataupun tidak berefek (Saifudin, 2014). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi lengkuas dengan keempat tanaman tidak menunjukkan efek sinergisme. Peningkatan aktivitas sitotoksik yang terjadi pada kombinasi lengkuas-kemukus, lengkuas-kayumanis, lengkuas-jeruk purut dan lengkuas-pinang dibandingkan aktivitas sitotoksik kemukus, kayumanis, jeruk purut dan pinang tunggal dikarenakan aktivitas sitotoksik yang berasal dari senyawa 1'-S-1'-acetoxyeugenol acetate (ACA) dalam lengkuas.

4. PENUTUP

4.1 Kesimpulan

Kombinasi fraksi etil asetat rimpang lengkuas dengan fraksi etil asetat buah kemukus, kulit kayumanis, daun jeruk purut dan biji pinang tidak menghasilkan efek sinergisme terhadap aktivitas sitotoksik sel T47D.

4.2 Saran

Untuk penelitian lebih lanjut sampel tanaman yang diteliti serta pelarut yang digunakan baik dalam proses ekstraksi maupun fraksinasi sebaiknya disesuaikan dengan referensi penelitian yang diacu.

PERSANTUNAN

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

DAFTAR PUSTAKA

- Aghaee F., Islamian J.P., Baradaran B., Mesbahi A., Mohammadzadeh M. and Jafarabadi M.A., 2013, Enhancing the Effects of Low Dose Doxorubicin Treatment by the Radiation in T47D and SKBR3 Breast Cancer Cells, *Journal of Breast Cancer*, 16 (2), 164-170.
- Anggraini D.R., 2014, Aktivitas Sitotoksik dan Induksi Apoptosis Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC.) terhadap Sel T47D (Human Breast Cancer Cell Line), *skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, Terapat di: http://etd.repository.ugm.ac.id/index.php?mod=penelitian_detail&sub=PenelitianDetail&act=view&typ=html&buku_id=73684 [Diakses pada 20 Juni 2019].
- Anindyajati, Sarmoko, Putri D. D. P., Hermawan A. and Meiyanto E., 2010, Combination of *Solanum nigrum* L. Herb Ethanolic Extract and Doxorubicin Performs Synergism on T47D Breast Cancer Cells, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 1 (2), 78-84.
- Astuti, Linda Tri., 2017, Isolasi Senyawa Sinamaldehyd dari Ekstrak Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii*) Menggunakan Pelarut Metanol, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UNY, Yogyakarta.
- CCRC, 2009, Prosedur Tetap Uji Kombinasi dengan Agen Kemoterapi, *Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta*, 2.
- CCRC, 2009, Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT, *Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta*, 6-9.
- CCRC, 2009, Sel T47D, *Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi*

- UGM Yogyakarta, Terdapat di: http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=1239 [Diakses pada 15 Mei 2018].
- Chouni A. and Paul S., 2018, A Review on Phytochemical and Pharmacological Potential of *Alpinia galangal*, *Pharmacogn J.*, 10 (1), 9-15.
- Dipiro J.T., Wells B.G., Schwinghammer T.L. and DiPiro C.V., 2017, Cancer Treatment and Chemotherapy, Dalam Cordes L.M., Tenth edition, *Pharmacotherapy: a Pathophysiologic Approach*, McGraw Hill Companies Inc, New York, p. 5575.
- Ferreira O. and Pinho S.P., 2012, Solubility of Flavonoids in Pure Solvents, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51 (18), 658-659.
- Fitria R., 2007, Aktivitas sitotoksik, anti proliferasi dan induksi apoptosis ekstrak dan fraksi biji pinang (*Areca catechu* L.) dengan dan tanpa kombinasi dengan Doksorubisin terhadap sel T47D, *Tesis*, Universitas Gajah Mada, Terdapat di: http://etd.repository.ugm.ac.id/index.php?mod=penelitian_detail&sub=PenelitianDetail&act=view&typ=html&buku_id=36863 [Diakses pada 23 Juli 2019].
- Gupta A., Naraniwal M. and Kothari V., 2018, Modern Extraction Methods for Preparation of Bioactive Plant Extracts, *International Journal Of Applied And Natural Sciences (IJANS)*, 1 (1), 8-26.
- Hidayati W.N., 2019, Pengaruh Variabilitas Kandungan Metabolit Lengkuas (*Alpinia Galanga*) Dari Jawa Tengah Dan Yogyakarta Terhadap Pertumbuhan Sel Kanker Payudara T47D Secara In Vitro, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Junqueira A.P.F., Perazzo F.F., Souza G.H.B. and Maistro E.L., 2007, Clastogenicity of Piper cubeba (Piperaceae) seed extract in an in vivo mammalian cell system, *Genetics and Molecular Biology*, 30 (3), 656-663.
- KemenKes RI, 2015, Infodatin Pusat Data dan Informasi Kesehatan RI, Jakarta.
- Mulyawati S., 2017, Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Metanol, Fraksi Butanol, Fraksi Etil Asetat, Dan Fraksi Kloroform Buah Kemukus (*Piper Cubeba*) Terhadap Sel Kanker T47D, *Skripsi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Peng W., Liu Yu-Jie, Wu N., Sun T., He Xiao-Yan, Gao Yong-Xiang and Wu Chun-Jie, 2015, *Areca catechu* L. (Arecaceae): A Review of its Traditional Uses, Botany, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology, *Journal of Ethnopharmacology*, Terdapat di: <http://sci-hub.tw/10.1016/j.jep.2015.02.010> [Diakses pada 23 Juli 2019].
- Rao P.V. and Gan S.H., 2014, Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014 (1), 12.
- Roell K.R., Reif D.M. and Motsinger-Reif A.A., 2017, An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy-Perspectives from Across Disciplines, *Front. Pharmacol.* 8, 58.
- Safarzadeh E., Shotorbani S.S. and Baradaran B., 2014, Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4 (1), 421-427.
- Saifudin A., 2014, *Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep, dan Teknik*

Pemurnian, Penerbit Deepublish, Yogyakarta.

- Sameni J., Sally K. and Mohini S., 2017, Solubility of Lignin and Acetylated Lignin in Organic Solvents, *Peer-Reviewed Article*, Terdapat di: <https://www.bioresources.com> [Diakses pada 9 Agustus 2019].
- Srisawat T., Parinuch C., Waraporn H., Yaowapa S. and Kanyanatt K., 2013, Phytochemical Screening and Cytotoxicity of Crude Extracts of *Vatica diospyroides* Symington Type LS, *Tropical Journal of Pharmaceutical*, 12 (1), 71-76.
- Suhendi A., Wikantyasning E.R., Setyadi G., Wahyuni A.S., Da'i M., 2017, Acetoxy Chavicol Acetate (ACA) Concentration and Cytotoxic Activity of *Alpinia galanga* Extract on HeLa, MCF7 and T47D Cancer Cell Lines, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 8 (2): 81-84.
- Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T.E., and Altman R.B., 2011, Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects, *NIH Public Access Author Manuscript*, 21 (7), 440–446.
- Tokyo Chemical Industry, 2018, Terpenes, Terdapat di: https://www.tcichemicals.com/eshop/en/ap/category_index/10872/ [Diakses pada 9 Agustus 2019].
- Tunjung W.A.S., Jr C., Michaelis M., Smales C.M., 2015, Anti-Cancer Effect of Kaffir Lime (*Citrus hystrix* DC) Leaf Extract in Cervical Cancer and Neuroblastoma Cell Lines, *Procedia Chemistry*, 14 (2015), 465-468.
- Wahab W.A., Adzmi A.N., 2017, The Investigation of Cytotoxic Effect of *Cinnamomum Zeylanicum* Extracts on Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7), *Science Heritage Journal*, 1(2), 23-28.
- Yubin J.I., Yu M., Wang B. and Zhang Y., 2014, The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6 (1), 338-345.
- Zeng Qiao-hui, Lu Chuan-Li, Zhang Xue-wu and Jian-Guo Jiang, 2015, Isolation and Identification of Ingredients Inducing Cancer Cell Death from the Seeds of *Alpinia Galanga*, a Chinese Spice, *Food and Function*, Issue 2, 2015.